

Peningkatan Patogenesitas Virus Laten Hasil Isolasi dari Kultur Sel Midgut Larva *Spodoptera litura* terhadap Larva *Spodoptera litura* melalui Penginfeksian Berulang

Muhammad Iqbal Filayani, Mahanani Tri Asri, Isnawati
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya

ABSTRAK

Nuclear polyhedrosis Virus (NPV) merupakan virus dari famili *Baculoviridae* yang menyerang Ordo *Lepidoptera*. *Nuclear polyhedrosis Virus* (NPV) yang menyerang *S. litura* dinamakan *Spodoptera litura Nuclear Polyhedrosis Virus* (SINPV). Perbanyakan SINPV bisa dilakukan dengan cara perbanyakan pada tubuh inang (*in vivo*) dan pada kultur sel midgut larva *S. litura* (*in vitro*). Perbanyakan pada kultur sel midgut ditemukan virus laten yang terekspresi dari sel midgut *S. litura*. Virus laten merupakan virus yang inaktif pada sel serangga inang. Virus laten memiliki patogenesitas sangat rendah. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan patogenesitas virus laten dengan penginfeksian berulang pada larva *S. litura* secara *in vivo*. Penelitian ini menggunakan larva *S. litura* instar 2 sejumlah 200 ekor dan konsentrasi virus laten yang digunakan $7,8 \times 10^7$ PIBs/ml. Hasil dari penelitian ini ialah patogenesitas virus laten meningkat jika dilakukan penginfeksian berulang, pada penginfeksian pertama mendapatkan mortalitas sebesar 14%, penginfeksian kedua mendapatkan mortalitas sebesar 63%, penginfeksian ketiga mendapatkan mortalitas sebesar 90%.

Kata kunci: *Nuclear polyhedrosis Virus* (NPV); Virus laten; penginfeksian berulang, peningkatan patogenesitas

ABSTRACT

Nuclear polyhedrosis virus (NPV) is a virus of the family *Baculoviridae* that attack *Lepidoptera*. *Nuclear polyhedrosis virus* (NPV) were attacked *S. litura* called *Spodoptera litura Nuclear Polyhedrosis Virus* (SINPV). SINPV Propagation can be done by multiplication of the host's body (*in vivo*) and in the larval midgut cell cultures *S. litura* (*in vitro*). Propagation in cell culture midgut expressed latent virus generated from midgut cells *S. litura*. Latent virus is inactive virus in cell larval. Latent virus has a very low pathogenicity. This study aimed to improve latent viral pathogenicity with recurrent infection at larval *S. litura* by *in vivo*. This research used larval *S. litura* second instar with 200 larval *S. litura* and latent virus concentration used 7.8×10^7 PIBs/ml. The results showed that the latent virus pathogenicity increase if infection done repeatedly, the first infection gain mortality by 14%, the second infection gain mortality by 63%, the third infection gain mortality by 90%.

Key words: *Nuclear polyhedrosis virus* (NPV); latent virus; infection repeatedly; increased pathogenicity

PENDAHULUAN

Spodoptera litura (ulat grayak) merupakan hama perusak pada berbagai komoditas pertanian di Indonesia. Ulat ini banyak menyerang tembakau dan juga tanaman pertanian lain, seperti kedelai, kacang tanah, kentang, cabai, bawang merah, kubis dan sebagainya. Penurunan hasil panen bisa mencapai 80% pada tanaman kedelai (Irfan dkk, 2007).

Salah satu agens hayati yang bisa dimanfaatkan dalam pengendalian ulat grayak adalah *Nuclear Polyhedrosis Virus* (NPV). *Nuclear Polyhedrosis Virus* merupakan virus dari genus

Baculoviridae yang memiliki DNA beruntai ganda (*double stranded DNA virus*) (Sembel, 2010).

Nuclear Polyhedrosis Virus yang menyerang *S. litura* dikenal dengan nama *Spodoptera litura Nucleopolyhedrosis Virus* (SINPV). Virus ini memiliki sifat yang menguntungkan jika diaplikasikan sebagai bioinsektisida antara lain (1) memiliki inang spesifik, sehingga aman terhadap organisme bukan sasaran, (2) tidak mempengaruhi parasitoid, predator dan serangga berguna lainnya, (3) dapat mengatasi masalah resistensi ulat grayak terhadap insektisida kimia, (4) kompatibel dengan insektisida kimiawi yang tidak bersifat basa kuat (Samsudin, 2008).

Usaha pengembangan SINPV sebagai biopestisida dilakukan dengan cara perbanyak SINPV secara *in vivo* dengan inang aslinya (ulat grayak) (Samsudin, 2011). Seiring berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi, NPV dapat pula diperbanyak secara *in vitro* (kultur sel pada laboratorium, yang tidak memerlukan keseluruhan sel serangga). Sistem kultur sel serangga yang saat ini sedang dikembangkan untuk perbanyak virus yang pada akhirnya dapat membuat pestisida virus lebih efektif (D'Amico, 1997). Pembiakan secara *in vitro* dapat dilakukan pada sel epitel *midgut* larva *S. litura* instar 4, 5 dan 6 dalam medium Grace's di laboratorium (Asri dkk. 2007). Pembiakan secara *in vitro* dapat dilakukan pada sel epitel *midgut* larva *S. litura* menghasilkan virus laten yang terekspresi dari sel *midgut* *S. litura*.

Virus laten merupakan virus yang inaktif yang terdapat pada sel serangga inang. Virus inaktif ini disebabkan inang dalam kondisi suhu rendah atau akibat dari perlakuan berbagai temperatur yang dapat membuat virus menjadi inaktif (King dkk, 1994). Uji pendahuluan yang dilakukan dengan menginfeksi virus laten yang diisolasi dari kultur sel *midgut* larva *S. litura* pada 10 larva *S. litura* instar 2, hanya satu larva *S. litura* yang mati akibat infeksi virus. Hal ini menunjukkan bahwa virus laten yang diisolasi dari kultur sel *midgut* larva *S. litura* memiliki patogenesitas sangat rendah.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan patogenesitas virus laten yang diisolasi dari kultur sel *midgut* larva *S. litura* melalui penginfeksian berulang pada larva *S. litura* instar 2.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Surabaya dan dilaksanakan pada bulan Juni 2012 – Januari 2013. Larva *S. litura* instar 2 diperoleh dari BALITTAS Malang. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: gelas ukur (Assisten, Germany 10 ml), tabung reaksi, rak tabung reaksi, kuas gambar, kertas label, kertas saring, nampan plastik, termometer, botol

vial R30, dan sprayer, syringe 1 ml, syringe 5 ml, syringe 10 ml, daun jarak muda, aquades, alkohol 70%.

Penelitian ini hanya menggunakan satu perlakuan yaitu penginfeksian virus laten hasil isolasi dari kultur sel *midgut* larva *S. litura* dengan konsentrasi $7,8 \times 10^7$ PIBs/ml. Penginfeksian dilakukan secara berulang dengan konsentrasi virus yang sama. Setiap penginfeksian menggunakan ulat *S. litura* sebanyak 200 ulat.

Uji patogenesitas pada penelitian ini merupakan uji untuk peningkatan patogenesitas dengan cara penginfeksian berulang. Penginfeksian pertama menggunakan virus laten yang diisolasi dari kultur sel *midgut* larva *S. litura*. Adapun langkah-langkah peningkatan patogenesitas ialah sebagai berikut: larutan virus disiapkan sebanyak 5 ml dengan konsentrasi $7,8 \times 10^7$ PIBs/ml. Daun jarak muda ukuran 1 cm² dicelupkan ke dalam larutan virus 5 ml. Pakan alami yang sudah ada virusnya diletakkan ke dalam botol vial. Larva *S. litura* instar 2 dimasukkan ke dalam wadah vial. Pengamatan (bentuk, tingkah laku, warna) dilakukan terhadap larva yang terinfeksi virus setelah penginfeksian. Jumlah larva *S. litura* yang mati akibat terinfeksi virus dihitung. Larva *S. litura* yang mati karena virus dimurnikan. Melakukan sentrifugasi hasil saring dari larutan virus disentrifugasi. Supernatan yang tidak mengandung virus dibuang dan diresuspensi dengan ditambahkan akuades steril. Suspensi virus dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Virus laten hasil dari penginfeksian pertama digunakan untuk penginfeksian kedua dengan langkah-langkah di atas begitu seterusnya sampai patogenesitas virus meningkat.

HASIL

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peningkatan patogenesitas virus laten dapat dilihat dari persentase mortalitas larva *S. litura* yang diinfeksi virus laten. Data peningkatan mortalitas larva *S. litura* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase mortalitas hasil penginfeksian berulang virus laten yang diisolasi dari kultur sel *midgut* larva *S. litura* pada larva *S. litura* instar 2.

Virus yang diinfeksi	Tingkatan penginfeksian	Jumlah larva mati akibat terkena virus laten	Persentase mortalitas (%)
Virus laten dari kultur sel <i>midgut</i>	Pertama	28	14
Virus laten hasil penginfeksian pertama	Kedua	126	63
Virus laten hasil penginfeksian kedua	Ketiga	180	90

Keterangan: Jumlah larva yang diinfeksi virus laten tiap-tiap penginfeksian berjumlah 200 ekor.

PEMBAHASAN

Peningkatan patogenesitas virus laten ini dikarenakan adanya proses adaptasi virus laten, yang berawal dari kultur sel midgut larva *S. litura*. Kondisi lingkungan dalam kultur sel berbeda dengan kondisi lingkungan alami yaitu di dalam tubuh inang. Kondisi lingkungan pada kultur sel disesuaikan dan dijaga sesuai dengan kebutuhan kehidupan sel (kebutuhan nutrisi, suhu, pH kultur sel yang sesuai dengan pH asli dalam midgut inang) yang pada tubuh inang setiap saat kondisinya bisa berubah.

Peningkatan patogenesitas virus laten melalui penginfeksi berulang bisa dilihat dari mekanisme infeksi virus laten. Mekanisme infeksi terbagi menjadi dua yaitu infeksi primer dan infeksi sekunder (Samsudin, 2011). Infeksi primer diawali dengan tertelannya *Occlusion Bodies* (OBs) yang masuk bersama makanan ke dalam tubuh serangga sampai menembus membran peritrofik dan menginfeksi sel kolumnar dan sel goblet sedangkan infeksi sekunder oleh *Budded Virus* yang menyerang seluruh sel dalam tubuh larva misalnya sel-sel trakea, sel-sel hemolimfa, badan lemak, epidermis (Samsudin, 2011).

Mekanisme infeksi primer terjadi jika larva memakan pakan alami yang sudah diberi virus laten dan dicerna sampai pada *midgut* larva. *Calyx* (*polyhedron envelope*) yang mengelilingi polyhedra (OBs) akan didegradasi oleh enzim proteinase, setelah itu membran pembungkus *Occlusion Bodies* (OBs) yang berupa protein polyhedrin akan didegradasi di dalam *midgut* serangga dalam suasana alkali sebelum mengeluarkan *Occlusion Derivat Viruses* (ODVs) (D'Amico dan Slavicek, 2012). Suasana alkali yang bagus untuk mendegradasi OBs berada di *midgut* larva (Rohrmann, 2011).

Enzim proteinase banyak ditemukan pada saluran pencernaan larva dan pada polyhedra itu sendiri, sedangkan polyhedra yang diperbanyak pada kultur sel kurang akan enzim proteinase (Rohrmann, 2011). Tahap selanjutnya, ODVs menembus membran peritrofik, ODVs membutuhkan enzim-enzim seperti enzim chitinase dan metalloprotease untuk menembus membran peritrofik karena dalam membran peritrofik tersusun atas lapisan khitin dan muchin. *Occlusion Derivat Viruses* (ODVs) melakukan fusi dengan membran plasma dan sel-sel epitel *midgut* yang merupakan target primer infeksi NPV, ketika sampai pada sel *midgut* ODVs aka mengeluarkan virion atau BVs (Rohrmann, 2011).

Virion atau BVs (*Budded viruses*) melepaskan nukleokapsid di sitoplasma. Nukleokapsid yang berada dalam sitoplasma sel *midgut* selanjutnya akan masuk ke dalam nukleus sambil melepaskan DNA dan membentuk stroma virogenik, dalam kondisi inilah, DNA tersebut melakukan replikasi atau memperbanyak diri di dalam inti sel inangnya. Inti sel yang telah terinfeksi selanjutnya membesar, kemudian *budding* dan mengeluarkan turunan virion baru hasil replikasi (Sanjaya dkk, 2011).

Tahap awal replikasi virion dihasilkan bentukan *Budded Viruses* (BVs). *Budded Viruses* (BVs) mempunyai protein untuk mengenali membran sel target yaitu protein gp64. Gen *gp64* merupakan penghasil protein gp64 yang berperan untuk pelekatan Bvs pada membran sel. *Budded Viruses* (BVs) akan menginfeksi sel-sel trakea, hemolimfa dan seluruh sel tubuh serangga inang. Tahap akhir dari replikasi virus dihasilkan ODVs yang akan dibungkus oleh OBs, semua tahapan replikasi terjadi di nukleus sel serangga inang (D'Amico dan Slavicek, 2012). Pada saat virus melakukan *budding* (penguncupan), virus mengambil membran inti sel inang menjadi selubung virus (*envelope*). Selanjutnya, untuk membentuk membran virus terluar (*polyhedra*), diambil dari membran sel pada sel inang (Asri dkk., 2007).

Melihat dari mekanisme infeksi virus di atas maka dapat dikatakan bahwa dengan diinfeksiannya virus laten pada larva *S. litura* virus mengalami peningkatan patogenesitas. Peningkatan patogenesitas virus laten tidak langsung terjadi pada saat pertama kali diinfeksi secara *in vivo* pada larva *S. litura*, namun peningkatan patogenesitas terjadi ketika diinfeksi secara berulang sebanyak tiga kali penginfeksi.

Hal ini membuktikan bahwa virus laten perlu adaptasi terlebih dahulu seperti menghasilkan protein-protein dan enzim-enzim yang digunakan untuk infeksi di dalam *midgut* larva misalnya enzim proteinase, enzim metalloprotease, protein gp64 untuk mengenali membran sel target pada seluruh tubuh larva. Alasan penginfeksi secara *in vivo* lebih membuat patogenesitas virus meningkat ialah nukleokapsid yang dilepaskan ODV ada yang langsung melewati membran sel dan membentuk *Budded Virus* tanpa harus menuju nukleus sel untuk bereplikasi (Miller, 1996 dalam Westenberg, 2004).

Adapun ciri-ciri larva *S. litura* yang terinfeksi virus laten pada tiap infeksi antara lain larva

malas untuk makan dan bergerak, cenderung naik ke atas botol vial, larva mati dengan tubuh hitam mengkilap dan mengeluarkan cairan putih keruh

SIMPULAN

Patogenesitas virus laten hasil isolasi dari kultur sel midgut larva *S. litura* dapat ditingkatkan melalui penginfeksi berulang, pada penginfeksi pertama didapatkan prosentase mortalitas larva *S. litura* sebesar 14%. Penginfeksi kedua didapatkan persentase mortalitas larva *S. litura* sebesar 60%. Penginfeksi ketiga didapatkan persentase mortalitas larva *S. litura* sebesar 90%.

DAFTAR PUSTAKA

- Asri MT, Ducha N, dan Pancawidyana D, 2007. Upaya Perbanyak *Spodoptera litura* Multipel Nucleopolyhedrosis Virus (SINPV) sebagai bioinsektisida Secara In Vitro dengan Teknik Kultur Sel Insekta. Laporan Penelitian. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
- D'Amico V, 1997. *Baculoviruses* (Baculoviridae). <http://www.nysciences.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogen/baculoviruses.html>. Diunduh tanggal 5 Oktober 2012.
- D'Amico V dan Slavicek J, 2012. *Interactions Between Nucleopolyhedroviruses and Polydnviruses in larval Lepidoptera*. http://www.nrs.fs.fed.us/pubs/jrnl/2012/nrs_2012_damico_001.pdf. Diunduh tanggal 5 Oktober 2012.
- Irfan B, Ekawati IW, dan Sari I, 2007. *Prospek Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) Sebagai Agens Hayati Pengendali Spodoptera litura*. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- King LA, Possee RD, Hughes DS, Atkinson AE, Palmer CP, Marlow SA, Pickering JM, Joyce KA, Lawrie AM, Miller DP, dan Beadle DJ, 1994. *Advances in Insect Virology Volume 25*. San Diego: Academic Press Inc
- Rohrmann G, 2011. *Baculovirus Molecular Biology: Second Edition*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49506/> / Diunduh tanggal 5 Oktober 2012.
- Samsudin, 2008. *Virus Patogen Serangga: Bio-Insektisida Ramah Lingkungan*. <http://www.pertaniansehat.or.id/?pilih=news&mod=yes&aksi=lihat&id=19>. Diunduh tanggal 8 Agustus 2010.
- Samsudin, 2011. *Uji Patologi dan Perbaikan Kinerja Spodoptera exigua Nuclear Polyhedrosis Virus (SeNPV)*. Bogor: Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sanjaya Y, Machmudin D, dan Kurniawati ND, 2011. Kajian Histologi Infeksi SINPV Terhadap Berat Badan dan Kerusakan Membran Peritrofik Larva *Spodoptera litura*. *Jurnal Bioteknologi*. 8 (2). 78-85
- Sembel DT, 2010. *Pengendalian Hayati Hama-Hama Serangga Tropis dan Gulma*. Yogyakarta: Penerbit Andi
- Westenberg M, 2004. *Functional Analysis of A Novel Baculovirus Envelope Fusion Protein*. Thesis Dutch: Wageningen University